

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 390918GA	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE99/03974	International filing date (day/month/year) 13 December 1999 (13.12.99)	Priority date (day/month/year) 16 December 1998 (16.12.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/87		
Applicant NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 4 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 01 July 2000 (01.07.00)	Date of completion of this report 22 March 2001 (22.03.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE99/03974

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-9, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. 1-23, filed with the letter of 21 February 2001 (21.02.2001),  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the drawings, sheets/fig 1/4-4/4, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages \_\_\_\_\_  
☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_  
☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 99/03974

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	7, 9, 18, 20	YES
	Claims	1-6, 8, 10-17, 19, 21-23	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-23	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

- D1: WO-98/06437
- D2: WO-A1-93/04701
- D3: Gene Therapy, (1997), 4, 891-900
- D4: WO-A1-95/25809
- D5: Gene Therapy, (1996), 3, 269-273
- D6: DNA, (1987), 6, 81-9

Claim 1 is directed to synthetic particles from a nucleic acid and a predominantly arginine protein with a molecular weight in the range of 3 900 - 4 300. The particles are formed in a simple manner by mixing two solutions which each contain one of the two substances. The particles are to be used for the transfection of cells.

D1 describes synthetic proteins in the relevant molecular weight range (cf. pages 44, 56, 57 of the document) for the production of complexes with nucleic acids. The complexes are obtained by simple mixture of the two components in aqueous solution (see Example 2). However, no proteins in the sense of the present Claim 1 are mentioned in the document as means of DNA complexation or condensation. This document therefore is not prejudicial

to the novelty of the subject matter of Claim 1.

D5 also does not mention the proteins of Claim 1 as complexation agent for DNA and therefore is not prejudicial to novelty.

D3, however, describes the production of the described DNA protamine complexes (cf. page 898, first column, last paragraph) and their use (injection of lipid-free protamine DNA complexes into mice; cf. page 893: sequential injection). The subject matter of Claims 1-6, 8, 10-17, 19 and 21-23 therefore is no longer novel under PCT Article 33(2).

D4 also anticipates the claimed particles (cf. Claim 1; also page 23, line 6: "protamines"). The diameter of the complexes of 90 nm and less mentioned in the document lies in the preferred range of the particles claimed in the present application. Claims 1-7 and 8 are not novel over D4.

It could not be definitely determined whether D2 (page 7; top of page 9) and D6 (cf. abstract; page 82) also disclose the claimed particles or not. The applicant argued that the particles claimed could only be obtained in the absence of buffers. The production methods in D2 and D6 would only contain soluble complexes. Without experimental proof this argument cannot be readily verified.

Insofar as the dependent claims mention substantive matter which is not explicitly described in the above-mentioned documents, inventive step cannot be recognized, because no surprising advantages of these embodiments over the particles and complexes disclosed in D3 have been claimed.

VERTRÄGE ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

# PCT

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>390918GA</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE 99/03974</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>13/12/1999</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>16/12/1998</b>
Anmelder		

**NOVEMBER AG NOVUS MEDICATUS BERTLING GESELLSCHAFT;**

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.  
☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

### 1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- ☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).
3. ☐ **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

### 4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

### 5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

### 6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_

- ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
- ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.
- ☒ keine der Abb.

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**

IPK 7 C12N15/87

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 06437 A (CHIRON CORP) 19. Februar 1998 (1998-02-19) s. Seite 44, 56-57 Anspruch 1; Beispiele 2,3 ---	1-27
X	WO 93 04701 A (UNIV CONNECTICUT) 18. März 1993 (1993-03-18) Seite 7 -Seite 9; Anspruch 1; Beispiel 1 ---	1-27
X	WO 95 25809 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE ;UNIV OHIO (US); Ferkol Thomas W Jr (US)) 28. September 1995 (1995-09-28) das ganze Dokument ---	1-27
X	EP 0 727 223 A (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO) 21. August 1996 (1996-08-21) Ansprüche 1-3 ---	1-27
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie<sup>o</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. April 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

17/05/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bardili, W

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LI, S. UND HUANG, L.: "In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNS (LPD) complexes" GENE THERAPY, Bd. 4, 1997, Seiten 891-900, XP000886074 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-27
X	WOLFERT, M.A. UND SEYMOUR, L.W.: "Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA" GENE THERAPY, Bd. 3, 1996, Seiten 269-73, XP000886345 Zusammenfassung	1-27
X	WIENHUES, U. ET AL.: "A novel method for transfection and expression of reconstituted DNA-protein complexes in eukaryotic cells " DNA, Bd. 6, 1987, Seiten 81-9, XP000560129 Zusammenfassung	1-27

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/03974

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 9806437	A	19-02-1998	EP 0941122 A	15-09-1999
W0 9304701	A	18-03-1993	AU 681997 B	18-09-1997
			AU 2678092 A	05-04-1993
			CA 2116107 A	18-03-1993
			EP 0666923 A	16-08-1995
			JP 7500820 T	26-01-1995
			US 6030954 A	29-02-2000
W0 9525809	A	28-09-1995	AU 696455 B	10-09-1998
			AU 2127695 A	09-10-1995
			CA 2186118 A	28-09-1995
			EP 0752005 A	08-01-1997
			JP 10503469 T	31-03-1998
			US 6008336 A	28-12-1999
			US 5972900 A	26-10-1999
			US 5972901 A	26-10-1999
			US 5877302 A	02-03-1999
			US 5844107 A	01-12-1998
EP 0727223	A	21-08-1996	AU 681192 B	21-08-1997
			AU 7706994 A	18-04-1995
			US 5912300 A	15-06-1999
			CA 2172974 A	06-04-1995
			W0 9509009 A	06-04-1995



(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 16 August 2000 (16.08.00)	ETATS-UNIS D'AMERIQUE in its capacity as elected Office
<b>International application No.</b> PCT/DE99/03974	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 390918GA
<b>International filing date</b> (day/month/year) 13 December 1999 (13.12.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 16 December 1998 (16.12.98)
<b>Applicant</b> JUNGHANS, Monika et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

01 July 2000 (01.07.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p><b>The International Bureau of WIPO</b>  <b>34, chemin des Colombettes</b>  <b>1211 Geneva 20, Switzerland</b></p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p><b>Henrik Nyberg</b></p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 17 August 2000 (17.08.00)	ETATS-UNIS D'AMERIQUE in its capacity as elected Office
<b>International application No.</b> PCT/DE99/03974	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 390918GA
<b>International filing date</b> (day/month/year) 13 December 1999 (13.12.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 16 December 1998 (16.12.98)
<b>Applicant</b> JUNGHANS, Monika et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

01 July 2000 (01.07.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

**The International Bureau of WIPO**  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Henrik Nyberg

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Copy for the designated Office (DO/)

**PATENT COOPERATION TREATY**

PCT/DE99/03974

**PCT**

From the INTERNATIONAL BUREAU

**NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE**

(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

GASSNER, Wolfgang  
Nägelsbachstrasse 49 A  
D-91052 Erlangen  
ALLEMAGNE

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 24 July 2000 (24.07.00)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
<b>Applicant's or agent's file reference</b> 390918GA	
<b>International application No.</b> PCT/DE99/03974	<b>International filing date</b> (day/month/year) 13 December 1999 (13.12.99)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

NOVEMBER AG NOVUS MEDICATUS  
BERTLING GESELLSCHAFT FÜR  
MOLEKULARE MEDIZIN  
Ulrich-Schalk-Strasse 3a  
D-91056 Erlangen  
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT  
GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN  
Ulrich-Schalk-Strasse 3a  
D-91056 Erlangen  
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned  
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Jocelyne Rey-Millet

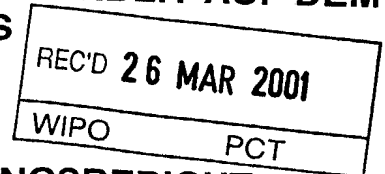
Telephone No.: (41-22) 338.83.38

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)





Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 390918GA	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03974	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13/12/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 16/12/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/87		
Anmelder <b>AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN</b> <b>NOVEMBER AG NOVUS MEDICATUS BERTLING GESELLSCHAFT;</b>		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).  
  
 Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  01/07/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  22.03.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Bardili, W  Tel. Nr. +49 89 2399 2132  

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03974

## I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

### Beschreibung, Seiten:

1-9                      ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-23                      eingegangen am                      21/02/2001    mit Schreiben vom                      21/02/2001

### Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4                      ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03974

- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,      Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	7,9,18,20
	Nein: Ansprüche	1-6,8,10,11-17,19,21-23
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-23
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-23
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen  
**siehe Beiblatt**

**Zu Punkt V**

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Auf folgende Entgegnhaltungen wird Bezug genommen:

D1: WO 98 06 437

D2: WO 93 04 701 A1

D3: Gene Therapy, (1997), 4, 891-900

D4: WO 95 25 809 A1

D5: Gene Therapy, (1996), 3, 269-273

D6: DNA, (1987), 6, 81-9

Anspruch 1 ist auf synthetische Partikel aus einer Nukleinsäure und einem zum überwiegenden Anteil aus Arginin bestehenden Protein mit einem Molekulargewicht im Bereich 3 900 - 4 300 gerichtet. Die Partikel werden in einfacher Weise durch Mischen zweier Lösungen, die jeweils einen der beiden Stoffe enthalten, hergestellt. Die Partikel sollen zur Transfektion von Zellen verwendet werden.

D1 beschreibt synthetische Proteine im relevanten Molekulargewichtsbereich (vgl. Seite 44, 56, 57 der Entgegnhaltung) zur Herstellung von Komplexen mit Nukleinsäuren. Die Komplexe werden durch einfaches Vermischen der beiden Komponenten in wäßriger Lösung erhalten (s. Beispiel 2). Allerdings werden keine Proteine im Sinne des vorliegenden Anspruches 1 in der Entgegnhaltung als Mittel zur DNA-Komplexierung bzw. Kondensierung genannt. Der Gegenstand des Anspruches 1 wird daher durch diese Entgegnhaltung nicht vorweggenommen.

D5 nennet ebenfalls nicht die Proteine des Anspruches 1 als Komplexierungsmittel für DNA und sind daher nicht neuheitsschädlich.

D3 aber beschreibt die Herstellung der beanspruchten DNA-

Protaminkomplexen (vgl. Seite 898, I. Spalte, letzter Abschnitt) sowie deren Verwendung (Injektion von lipidfreien Protamin- DNA- Komplexen in Mäuse; vgl. Seite 893: sequentielle Injektion). Daher ist der Gegenstand der Ansprüche 1-6, 8, 10-17, 19, 21-23 nicht mehr neu im Sinne des Artikels 33 (2) PCT.

Ebenso nimmt die Entgegenhaltung D4 die beanspruchten Partikel vorweg (vgl. Anspruch 1; ferner Seite 23, Zeile 6: 'protamines'). Der in der Entgegenhaltung genannte Durchmesser der Komplexe von 90 nm und weniger liegt im bevorzugten Bereich der in der vorliegenden Anmeldung beanspruchten Partikel. Die Ansprüche 1-7, und 8 sind gegenüber D4 nicht mehr neu.

Ob die Entgegenhaltungen D2 (Seite 7; Seite 9 oben) und D6 (vgl. abstract; Seite 82) ebenfalls die beanspruchten Partikel offenbaren oder nicht, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Die Anmelderin brachte sinngemäß vor, die von ihr beanspruchten Partikel könnten nur in Abwesenheit von Puffern erhalten werden. Bei den in D2 bzw. D6 beschriebenen Herstellungsverfahren würden lediglich lösliche Komplexe erhalten. Ohne experimentelle Bestätigung kann diesem Argument nicht ohne weiteres gefolgt werden.

Insoweit in den Unteransprüchen Sachverhalte genannt sind, die nicht explizit in den obigen Entgegenhaltungen vorbeschrieben sind, kann erfinderische Tätigkeit nicht anerkannt werden, da überraschende Vorteile dieser Ausgestaltungen des Anmeldungsgegenstandes gegenüber den in D3 offenbarten Partikeln bzw. Komplexen nicht geltend gemacht wurden.



## Neue Patentansprüche

1. Synthetisches Partikel bestehend aus mindestens einer Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz und einem zum  
5 überwiegenden Anteil aus Arginin bestehenden Protein mit einem Molekulargewicht im Bereich von 3900 bis 4300.
2. Synthetisches Partikel nach Anspruch 1, wobei das Protein aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Protamin, Protaminbase, Protaminderivate oder -salze, vorzugsweise Protaminsulfat oder Protaminchlorid.  
10
3. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuresequenz einzelsträngig ausgebildet ist.  
15
4. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuresequenz ein Oligonukleotid oder ein Derivat davon ist.  
20
5. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Oligonukleotid aus mindestens 5 Nukleotiden besteht.
- 25 6. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Derivat ein Phosphorothioat oder ein anionisches Derivat ist.
- 30 7. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der mittlere Durchmesser des Partikels im Bereich von 10 nm bis 100 µm liegt.

8. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Partikel eine elektrische Oberflächenladung trägt.

5

9. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Oberflächenladung im Bereich von -40 mV bis +40 mV liegt.

10 10. Verfahren zur Herstellung synthetischer Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche mit folgenden Schritten:

15 a) Herstellen einer ein Protein mit einem Molekulargewicht im Bereich von 3900 bis 4300 enthaltenden wässrigen ersten salzfreien Lösung, wobei das Protein zum überwiegenden Anteil aus Arginin besteht,

20 b) Versetzen der ersten Lösung mit einer eine Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz enthaltenden zweiten salzfreien Lösung und

c) Mischen der ersten und der zweiten Lösung.

25 11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei zur Herstellung einer vorgegebenen Oberflächenladung das molare Verhältnis von Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz zu Protein eingestellt wird.

30 12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, wobei das Protein aus der folgenden Gruppe ausgewählt wird: Protamin, Protamin-

base, Protaminderivate oder -salze, vorzugsweise Protaminsulfat oder Protaminchlorid.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei Protamin, Protaminbase, Protaminderivate aus dem Sperma von Lachs gewonnen wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, wobei die Nukleinsäuresequenz einzelsträngig ausgebildet ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Nukleinsäuresequenz ein Oligonukleotid oder ein Derivat davon ist.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das Oligonukleotid aus mindestens 5 Nukleotiden besteht

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 oder 16, wobei das Derivat ein Phosphorothioat oder ein anionisches Derivat ist.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 17, wobei der Durchmesser des Partikels im Bereich von 10 nm bis 100 µm liegt.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 18, wobei das Partikel eine elektrische Oberflächenladung trägt.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 19, wobei die Oberflächenladung im Bereich von -40mV bis +40 mV liegt.

21. Verwendung eines zum überwiegenden Anteil aus Arginin bestehenden Proteins mit einem Molekulargewicht im Bereich von 3900 bis 4300 zur Herstellung eines synthetischen Parti-

kels bestehend aus dem Protein und mindestens einer Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz.

- 22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei das Protein aus der  
5 folgenden Gruppe ausgewählt ist: Protamin, Protaminbase, Protaminderivate oder -salze, vorzugsweise Protaminsulfat oder Protaminchlorid.
- 10 23. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 oder 22, wobei die Nukleinsäuresequenz ein, vorzugsweise einzelsträngiges, vorzugsweise aus mindestens 5 Nukleotiden bestehendes, Oligonukleotid oder ein, vorzugsweise als Phosphorothioat vorliegendes, Derivat davon ist.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 99/03974

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/87

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 06437 A (CHIRON CORP) 19 February 1998 (1998-02-19) s. Seite 44, 56-57 claim 1; examples 2,3	1-27
X	WO 93 04701 A (UNIV CONNECTICUT) 18 March 1993 (1993-03-18) page 7 -page 9; claim 1; example 1	1-27
X	WO 95 25809 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE ; UNIV OHIO (US); FERKOL THOMAS W JR (US)) 28 September 1995 (1995-09-28) the whole document	1-27
X	EP 0 727 223 A (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO) 21 August 1996 (1996-08-21) claims 1-3	1-27
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 April 2000

Date of mailing of the international search report

17/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 990 01

Authorized officer

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/03974

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LI, S. UND HUANG, L.: "In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNS (LPD) complexes"</p> <p>GENE THERAPY, vol. 4, 1997, pages 891-900, XP000886074</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p>	1-27
X	<p>WOLFERT, M.A. UND SEYMOUR, L.W.: "Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA"</p> <p>GENE THERAPY, vol. 3, 1996, pages 269-73, XP000886345</p> <p>abstract</p>	1-27
X	<p>WIENHUES, U. ET AL.: "A novel method for transfection and expression of reconstituted DNA-protein complexes in eukaryotic cells "</p> <p>DNA, vol. 6, 1987, pages 81-9, XP000560129</p> <p>abstract</p>	1-27

## Synthetisches Nucleinsäure-Partikel

Die Erfindung betrifft ein synthetisches Nucleinsäure-  
Partikel bzw. Partikel, ein Verfahren zu dessen Herstellung  
5 sowie eine Verwendung.

Es ist bekannt, daß Mononukleotide an Clupeine binden (G.  
D'Auria, L. Paolillo, R. Sartorio and S. Wurzbürger (1993):  
Structure and function of protamines: an  $^1\text{H}$  nuclear magnetic  
10 resonance investigation of the interaction of clupeines with  
mononucleotides, Biochim. Biophys. Acta, 1162, 209-216).

Nach dem Stand der Technik ist es außerdem bekannt, Komplex-  
verbindungen zwischen doppelsträngigen Oligonukleotiden, po-  
15 lykationischen Polymeren und Lipiden herzustellen. Dazu wird  
auf die folgenden Literaturstellen verwiesen:

A.V. Kabanov and V.A. Kabanov (1995): DNA Complexes with po-  
lycations for the Delivery of Genetic Material into Cells,  
20 Bioconjugate Chem., 6, 7-20;

Gao and L. Huang (1996): Potentiation of Cationic Liposome-  
Mediated Gene Delivery by Polycations, Biochemistry, 35,  
1027, 1036;

25 L. Sorgi, S. Bhattacharya and L. Huang (1997): Protamine sul-  
fate enhances lipid-mediated gene transfer, Gene Therapy, 4,  
961-968;

Li and L. Huang (1997): In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes, Gene Therapy, 4, 891-900.

- 5 Solche Komplexverbindungen können z.B. zur Transfektion von Plasmid-DNA verwendet werden. Sofern als Polykation an Transferrin gebundenes Protamin verwendet wird, bezeichnet man solche Komplexverbindungen auch als Transferrin-Protamin-DNA-Komplexe. Derartige Komplexe bilden keine kondensierten DNA-
- 10 Strukturen bzw. Partikel (Wagner, M. Zenke, M. Cotten, H. Beug and M.L. Birnstiel (1990): Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 3410-3414).
- 15 Die bekannten Komplexverbindungen können nur aus zuvor gebildeten Partikeln oder bestehenden Komplexen gebildet werden. Dazu muß neben einem Protein auch ein Lipid vorhanden sein. Diese Komplexverbindungen können nachteiligerweise keine partikulären Strukturen aus Oligonukleotiden bilden. Die DNA
- 20 liegt in der Komplexverbindung nur oberflächlich adsorptiv gebunden vor. Sie kann nachteiligerweise enzymatisch abgebaut werden. Schließlich eignen sich die bekannten Komplexverbindungen nicht zur Herstellung von Arzneimitteln mit Depotwirkung.
- 25 Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es sollen insbesondere ein stabiles synthetisches Partikel und ein Verfahren seiner Herstellung angegeben werden, das eine hohe Transfektionseffektivität ermöglicht. Das synthetische Partikel soll möglichst auch
- 30 zur Herstellung von Arzneimitteln mit Depotwirkung geeignet sein.



Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 11 und 24 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 10, 12 bis 23 und 25 bis 27.

5

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein synthetisches Partikel aus mindestens einer Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz und einem Protein mit einem Molekulargewicht von 3900 bis 4300 gebildet. Ein solches synthetisches Partikel ist insbesondere gegenüber einem enzymatischen Abbau stabil. Es ermöglicht eine hohe Transfektionseffizienz sowie die Herstellung von Arzneimitteln mit Depotwirkung.

Nach einem Ausgestaltungsmerkmal besteht das Protein zum überwiegenden Anteil aus Arginin. Vorteilhafterweise beträgt der Argininanteil mehr als 60 Gewichts%. Das Protein kann aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Protamin, Protaminbase, Protaminderivate oder -salze, vorzugsweise Protaminsulfat oder Protaminchlorid. Die vorgenannten Verbindungen haben vorteilhafterweise keine antigenen Eigenschaften.

Die, vorteilhafterweise einzelstängig ausgebildete, Nukleinsäuresequenz kann ein Oligonukleotid oder ein Derivat davon sein. Das Oligonukleotid besteht vorzugsweise aus mindestens 5 Nukleotiden. Das Derivat kann ein Phosphorothioat oder ein anionisches Derivat sein. Beim Oligonukleotid kann es sich insbesondere um ein DNA-Oligonukleotid handeln. Das ermöglicht einen Einsatz der synthetischen Partikel zur Antisense-Therapie.

30

Je nach Anwendungszweck kann der mittlere Durchmesser des Partikels im Bereich von 10 nm bis 100  $\mu$ m liegen.

Das Partikel trägt vorteilhafterweise eine elektrische Oberflächenladung, die vorzugsweise im Bereich von -40 mV bis +40 mV liegen kann. Dadurch kann weiter die Transfektionseffizienz erhöht werden.

Nach der verfahrensseitigen Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen synthetischen Partikel mit folgenden Schritten vorgesehen:

a) Herstellung einer ein Protein mit einem Molekulargewicht im Bereich von 3900 bis 4300 enthaltenden wässrigen ersten Lösung,

b) Versetzen der ersten Lösung mit einer eine Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz enthaltenden zweiten Lösung und

c) Mischen der ersten und zweiten Lösung.

Das Verfahren ermöglicht auf einfache Weise die Herstellung der erfindungsgemäßen synthetischen Partikel.

Nach einem Ausgestaltungsmerkmal sind die erste und die zweite Lösung salzfrei. Zur Erzeugung einer vorgegebenen Oberflächenladung kann das molare Verhältnis von Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz zu Protein eingestellt werden. Die vorgeschlagene Variante läßt sich besonders einfach durchführen.

Das Protein besteht zweckmäßigerweise zum überwiegenden Anteil aus Arginin, wobei es aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein kann: Protamin, Protaminbase, Protaminderivate oder -salze, vorzugsweise Protaminsulfat oder Protaminchlorid. Insbesondere Protamin, Protaminbase oder Protaminderivate können aus dem Sperma von Lachs gewonnen werden. Eine einfache und billige Verfügbarkeit ist damit gewährleistet.

- 10 Die, vorteilhafterweise einzelstängig ausgebildete, Nukleinsäuresequenz kann ein Oligonukleotid oder ein Derivat davon sein. Das Oligonukleotid besteht vorzugsweise aus mindestens 5 Nukleotiden. Das Derivat kann ein Phosphorothioat oder ein anionisches Derivat sein. Der Durchmesser des Partikels kann  
15 je nach Anwendungszweck im Bereich von 10 nm bis 100 µm liegen. Es kann eine elektrische Oberflächenladung tragen, die zweckmäßigerweise im Bereich von -40 mV bis +40 mV liegt.

- Nach einer weiteren Lösung der Aufgabe ist die Verwendung eines Proteins mit einem Molekulargewicht im Bereich von 3900  
20 bis 4300 zur Herstellung eines mindestens eine Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz enthaltenden synthetischen Partikels vorgesehen.

- 25 Das vorteilhafterweise zum überwiegenden Anteil aus Arginin bestehende Protein kann aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Protamin, Protaminbase, Protaminderivat oder -salze, vorzugsweise Protaminsulfat oder Protaminchlorid. Die, vorteilhafterweise einzelstängig ausgebildete, Nukleinsäuresequenz  
30 kann ein, vorzugsweise aus mindestens 5 Nukleotiden bestehendes, Oligonukleotid oder ein Derivat davon sein. Das Derivat

kann ein Phosphorothioat oder ein anionisches Derivat sein. Beim Oligonukleotid handelt es sich zweckmäßigerweise um ein DNA-Oligonukleotid.

- 5 Das erfindungsgemäße synthetische Partikel ist vorteilhafterweise ausschließlich aus der Nukleinsäure bzw. dem Nukleinsäurederivat und dem Protein mit dem Molekulargewicht im Bereich von 3900 bis 4300 gebildet. Das Molekulargewicht des Proteins beträgt nach einer besonders vorteilhaften Ausführungsform zwischen 4000 und 4250.

Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele der Erfindung an Hand der Zeichnung und an Hand von Beispielen näher erläutert. In der Zeichnungen zeigen:

- 15 Fig. 1a eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme synthetischer Partikel mit negativer Oberflächenladung,
- 20 Fig. 1b eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme synthetischer Partikel mit positiver Oberflächenladung,
- 25 Fig. 2 die Abhängigkeit der Partikelgröße von der Inkubationszeit,
- Fig. 3 die Abhängigkeit der Oberflächenladung vom Verhältnis Protamin/ Oligonukleotid,
- 30 Fig. 4a eine confokale laserscannmikroskopische Aufnahme einer ersten Vero-Zelle.

Fig. 4b eine confokale laserscannmikroskopische Aufnahme einer zweiten Vero-Zelle.

- 5 Fig. 5 die Abhängigkeit der UV-Absorption bei 260 nm von der Retentionszeit für Partikel mit unterschiedlicher Protamin/Oligonukleotid-Zusammensetzung.

Beispiele:

10

1. Die Herstellung von Oligonukleotidpartikel mit negativer Oberflächenladung

15 500  $\mu$ l einer Protaminlösung (50  $\mu$ g/ml) in doppelt destilliertem Wasser werden in einem Eppendorf-Cap bei Raumtemperatur spontan zu 300  $\mu$ l einer ebenso salzfreien Oligonukleotidlösung (100  $\mu$ g/ml) gegeben. Als Oligonukleotide sind vorzugsweise einzelsträngige DNA-Oligonukleotide in der Lösung enthalten. Die Lösung wird danach intensiv für 1 Minute mit einem schnell laufenden Rührwerk gemischt. Die Partikelbildung  
20 setzt dabei spontan ein und ist nach einer halben Stunde abgeschlossen. Das Gewichtsverhältnis zwischen dem eingesetzten Protaminmolekül und dem Oligonukleotid beträgt ca. 0,75 bis 1. Das Gewichtsverhältnis zwischen Protamin und dem Oligonukleotid zur Partikelbildung beträgt ca. 1:2,5.  
25

2. Die Herstellung von Oligonukleotidpartikel mit positiver Oberflächenladung

30 Basierend auf dem Verfahren in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren werden 500  $\mu$ l einer Protaminlösung (250  $\mu$ g/ml) in dop-

pelt destilliertem Wasser in einem Eppendorf-Cap bei Raumtemperatur spontan zu 500  $\mu$ l einer ebenso salzfreien Oligonukleotidlösung (100  $\mu$ g/ml) gegeben. Das molare Verhältnis zwischen Protamin und dem Oligonukleotid beträgt ca. 3:1.

5

Fig. 1a zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines synthetischen Partikels mit negativer Oberflächenladung. Das Gewichtsverhältnis zwischen Protamin und Oligonukleotid hat hier 1:2 betragen. In Fig. 1b ist ein synthetischer Partikel mit positiver Oberflächenladung gezeigt. Das Gewichtsverhältnis zwischen Protamin und Oligonukleotid hat hier 2,5:1 betragen.

10

Fig. 2 zeigt die Abhängigkeit der Inkubationszeit vom Gewichtsverhältnis Protamin/Oligonukleotid. Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt die Partikelgröße zu. Es können so beliebige Partikelgrößen eingestellt werden.

15

Fig. 3 zeigt die Abhängigkeit des Zetapotentials vom Gewichtsverhältnis Protamin/Oligonukleotid. Mit zunehmendem Anteil an Protamin verschiebt sich das Zetapotential zu positiven Werten hin.

20

Die Fig. 4a und b zeigen im Vergleich die Aufnahme von Oligonukleotiden mittels synthetischer Partikel (Fig. 4a) in Vero-Zellen. In Fig. 4b ist eine Kontrollinkubation gelöster Oligonukleotide gezeigt. Die Oligonukleotidkonzentration beträgt 5  $\mu$ g/ml bei einer Inkubationszeit von vier Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Es zeigt sich, dass unter Verwendung der erfindungsgemäßen synthetischen Partikel Oligonukleotide verstärkt in Zellen aufgenommen werden.

25

30

5 In Fig. 5 ist die Stabilität der erfindungsgemäßen Partikel gegenüber einem enzymatischen Abbau durch Endonukleasen gezeigt. Es ist die UV- Absorption bei 260 nm über der Retentionszeit für verschiedene Protamin/Oligonukleotid-Verhältnisse aufgetragen. Die Ergebnisse zeigen, daß das erfindungsgemäße Partikel einen nahezu quantitativen Schutz vor einem enzymatischen Abbau gewährleistet.

## Patentansprüche

1. Synthetisches Partikel gebildet aus mindestens einer Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz und einem Protein  
5 mit einem Molekulargewicht im Bereich von 3900 bis 4300.
2. Synthetisches Partikel nach Anspruch 1, wobei das Protein zum überwiegenden Anteil aus Arginin besteht.
- 10 3. Synthetisches Partikel nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Protein aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Protamin, Protaminbase, Protaminderivate oder -salze, vorzugsweise Protaminsulfat oder Protaminchlorid.
- 15 4. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuresequenz einzelsträngig ausgebildet ist.
- 20 5. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäuresequenz ein Oligonukleotid oder ein Derivat davon ist.
- 25 6. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Oligonukleotid aus mindestens 5 Nukleotiden besteht.
7. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Derivat ein Phosphorothioat oder ein anionisches Derivat ist.



8. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der mittlere Durchmesser des Partikels im Bereich von 10 nm bis 100  $\mu$ m liegt.
- 5 9. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Partikel eine elektrische Oberflächenladung trägt.
- 10 10. Synthetisches Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Oberflächenladung im Bereich von -40 mV bis +40 mV liegt.
- 15 11. Verfahren zur Herstellung synthetischer Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche mit folgenden Schritten:
- a) Herstellen einer ersten Lösung mit einem Molekulargewicht im Bereich von 3900 bis 4300 enthaltenden wässrigen ersten Lösung,
- 20 b) Versetzen der ersten Lösung mit einer Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz enthaltenden zweiten Lösung und
- 25 c) Mischen der ersten und der zweiten Lösung.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die erste und die zweite Lösung salzfrei sind.
- 30 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 oder 12, wobei zur Herstellung einer vorgegebenen Oberflächenladung das molare

Verhältnis von Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz zu Protein eingestellt wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, wobei das  
5 Protein zum überwiegenden Anteil aus Arginin besteht.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14, wobei das  
Protein aus der folgenden Gruppe ausgewählt wird: Protamin,  
Protaminbase, Protaminderivate oder -salze, vorzugsweise Pro-  
10 taminsulfat oder Protaminchlorid.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei Protamin, Protaminba-  
se, Protaminderivate aus dem Sperma von Lachs gewonnen wird.

15 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 16, wobei die  
Nukleinsäuresequenz einzelsträngig ausgebildet ist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Nukleinsäurese-  
quenz ein Oligonukleotid oder ein Derivat davon ist.  
20

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei das Oligonukleotid aus  
mindestens 5 Nukleotiden besteht

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei das  
25 Derivat ein Phosphorothioat oder ein anionisches Derivat ist.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 20, wobei der  
Durchmesser des Partikels im Bereich von 10 nm bis 100 µm  
liegt.  
30

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 21, wobei das Partikel eine elektrische Oberflächenladung trägt.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 22, wobei die  
5\* Oberflächenladung im Bereich von -40mV bis +40 mV liegt.
24. Verwendung eines Proteins mit einem Molekulargewicht im Bereich von 3900 bis 4300 zur Herstellung eines mindestens eine Nukleinsäure- oder Nukleinsäurederivatsequenz enthal-  
10 den synthetischen Partikels.
25. Verwendung nach Anspruch 24, wobei das Protein zum über-  
wiegenden Anteil aus Arginin besteht.
- 15 26. Verwendung nach Anspruch 24 oder 25, wobei das Protein aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Protamin, Protaminbase, Protaminderivate oder -salze, vorzugsweise Protaminsulfat oder Protaminchlorid.
- 20 27. Verwendung nach einem der Ansprüche 24 bis 26, wobei die Nukleinsäuresequenz ein, vorzugsweise einzelsträngiges, vorzugsweise aus mindestens 5 Nukleotiden bestehendes, Oligonukleotid oder ein, vorzugsweise als Phosphorothioat vorliegendes, Derivat davon ist.

PCT/DE 99/03974

## Bardili W

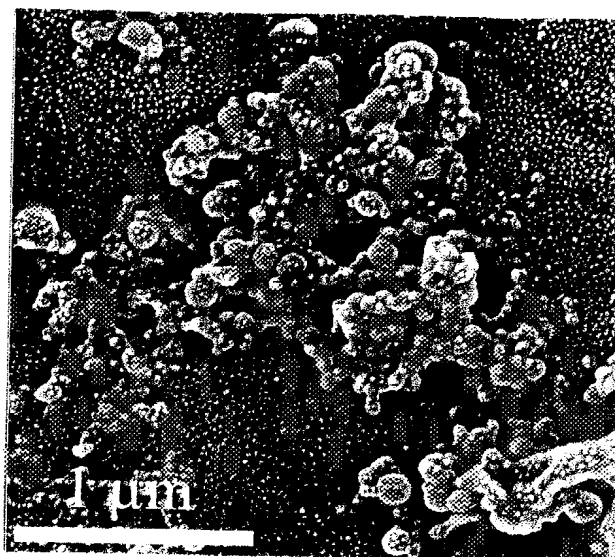
# INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Inter. Aktenzeichen

PCT/DE 99/03974

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>LI, S. UND HUANG, L.: "In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNS (LPD) complexes"</p> <p>GENE THERAPY, Bd. 4, 1997, Seiten 891-900, XP000886074</p> <p>in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	1-27
X	<p>WOLFERT, M.A. UND SEYMOUR, L.W.: "Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA"</p> <p>GENE THERAPY, Bd. 3, 1996, Seiten 269-73, XP000886345</p> <p>Zusammenfassung</p>	1-27
X	<p>WIENHUES, U. ET AL.: "A novel method for transfection and expression of reconstituted DNA-protein complexes in eukaryotic cells"</p> <p>DNA, Bd. 6, 1987, Seiten 81-9, XP000560129</p> <p>Zusammenfassung</p>	1-27



*Fig. 1a*



*Fig. 1b*

2/4

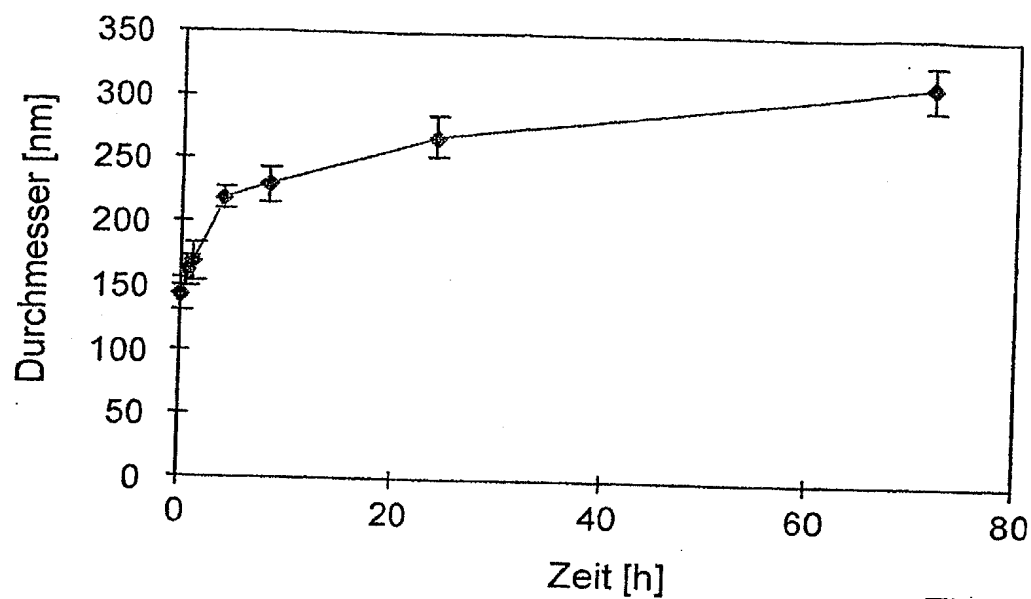


Fig. 2

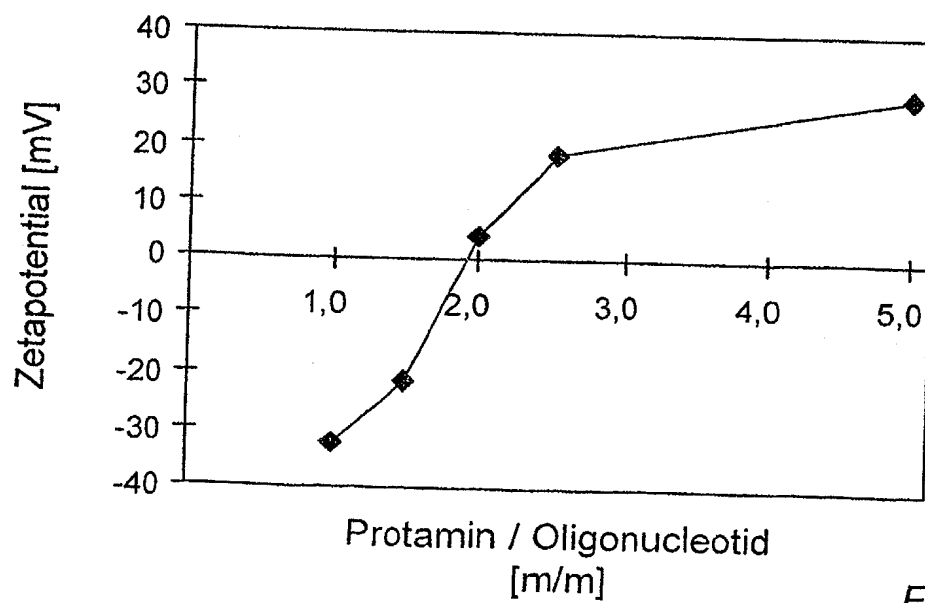
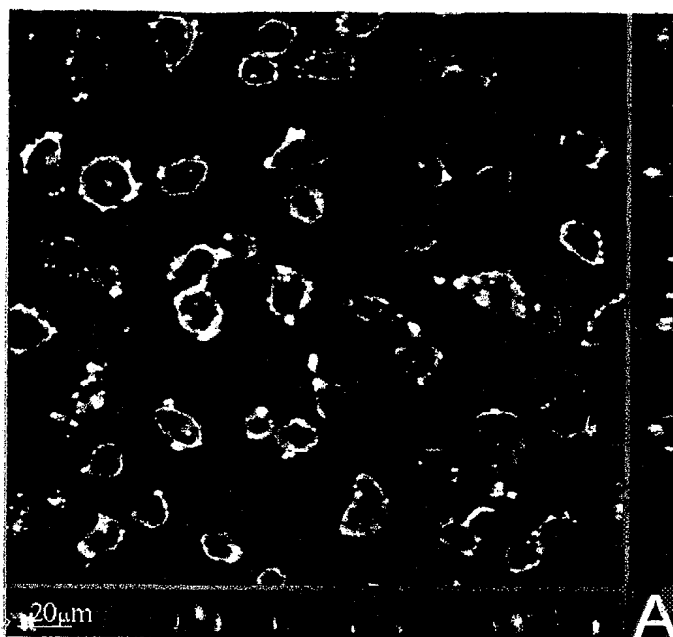
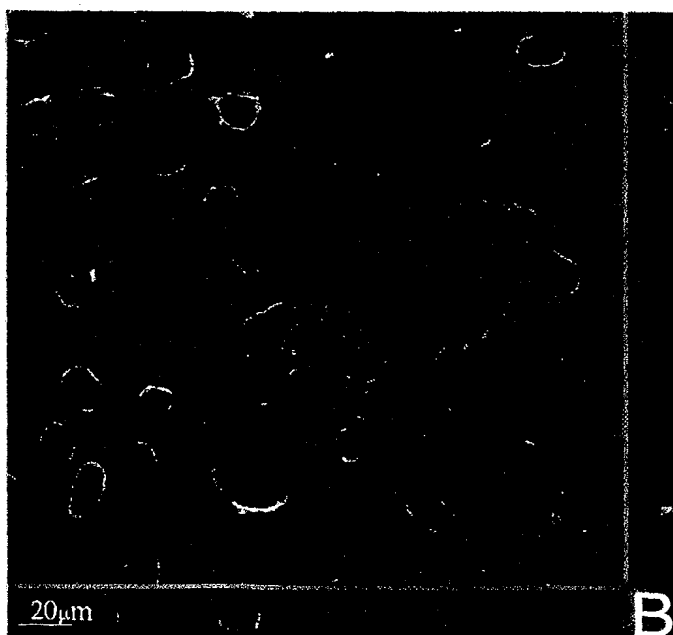


Fig. 3



*Fig. 4a*



*Fig. 4b*



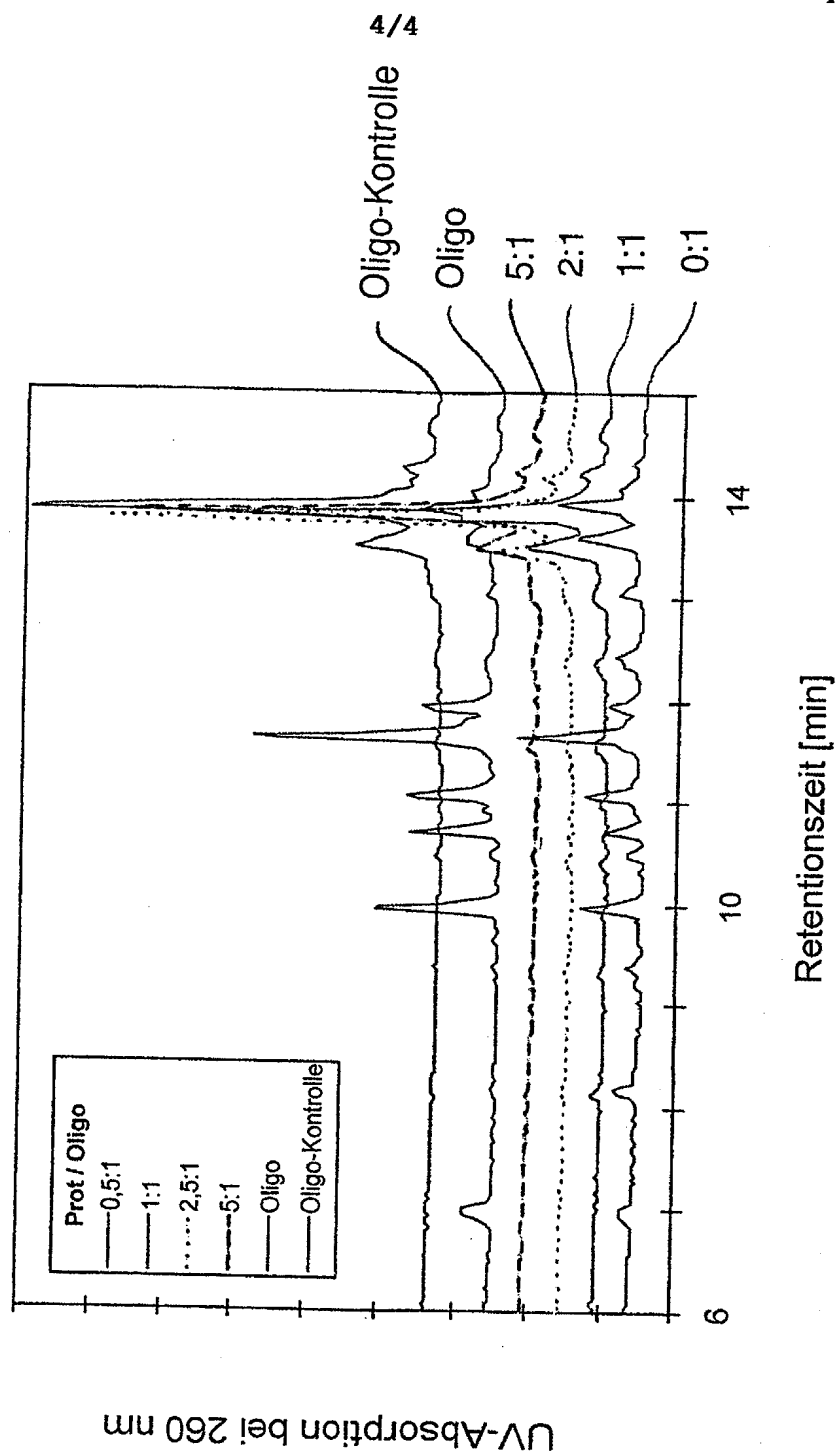


Fig. 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter: International Application No

PCT/DE 99/03974

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9806437 A	19-02-1998	EP 0941122 A	15-09-1999
WO 9304701 A	18-03-1993	AU 681997 B	18-09-1997
		AU 2678092 A	05-04-1993
		CA 2116107 A	18-03-1993
		EP 0666923 A	16-08-1995
		JP 7500820 T	26-01-1995
		US 6030954 A	29-02-2000
WO 9525809 A	28-09-1995	AU 696455 B	10-09-1998
		AU 2127695 A	09-10-1995
		CA 2186118 A	28-09-1995
		EP 0752005 A	08-01-1997
		JP 10503469 T	31-03-1998
		US 6008336 A	28-12-1999
		US 5972900 A	26-10-1999
		US 5972901 A	26-10-1999
		US 5877302 A	02-03-1999
		US 5844107 A	01-12-1998
EP 0727223 A	21-08-1996	AU 681192 B	21-08-1997
		AU 7706994 A	18-04-1995
		US 5912300 A	15-06-1999
		CA 2172974 A	06-04-1995
		WO 9509009 A	06-04-1995

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 99/03974

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9806437 A	19-02-1998	EP 0941122 A	15-09-1999
WO 9304701 A	18-03-1993	AU 681997 B	18-09-1997
		AU 2678092 A	05-04-1993
		CA 2116107 A	18-03-1993
		EP 0666923 A	16-08-1995
		JP 7500820 T	26-01-1995
		US 6030954 A	29-02-2000
WO 9525809 A	28-09-1995	AU 696455 B	10-09-1998
		AU 2127695 A	09-10-1995
		CA 2186118 A	28-09-1995
		EP 0752005 A	08-01-1997
		JP 10503469 T	31-03-1998
		US 6008336 A	28-12-1999
		US 5972900 A	26-10-1999
		US 5972901 A	26-10-1999
		US 5877302 A	02-03-1999
		US 5844107 A	01-12-1998
EP 0727223 A	21-08-1996	AU 681192 B	21-08-1997
		AU 7706994 A	18-04-1995
		US 5912300 A	15-06-1999
		CA 2172974 A	06-04-1995
		WO 9509009 A	06-04-1995